慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	慢性疼痛に関わる感覚神経のネットワーク形成メカニズムの解明と治療法開発
Sub Title	Analysis for the touch and pain receptive network formation
Author	芝田, 晋介(Shibata, Shinsuke) 佐藤, 桃香(Sato, Momoka) 名越, 慈人(Nagoshi, Narihito)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	Musashi2およびPleiotrophinを欠損したマウスが触覚および温痛覚異常を呈したことから、発生過程における感覚神経ネットワーク形成にRNA結合蛋白質Musashi2とその下流標的因子であるPleiotrophinの発現調節機構が重要であることが分かった。また神経障害後の慢性疼痛発生機序にもこのメカニズムが重要な役割を果たしていることが示唆された。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2010～2012 課題番号：22600011 研究分野：神経科学・発生学 科研費の分科・細目：疼痛学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22600011seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010～2012
課題番号：22600011

研究課題名（和文）　慢性疼痛に関わる感覚神経のネットワーク形成メカニズムの解明と治療法開発

研究課題名（英文）　Analysis for the touch and pain receptive network formation

研究代表者
芝田　晋介　（SHIBATA SHINSUKE）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70407089

研究成果の概要（和文）：Musashi2 および Pleiotrophin を欠損したマウスが触覚および温痛覚異常を呈したことから、発生過程における感覚神経ネットワーク形成に RNA 結合蛋白質 Musashi2 とその下流標的因子である Pleiotrophin の発現調節機構が重要であることが分かった。また神経障害後の慢性疼痛発生機序にもこのメカニズムが重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The expression regulatory mechanism of Pleiotrophin by the RNA-binding protein Musashi2 is quite important for normal sensory network formation during development through the evidences of abnormal sensation in Pleiotrophin and Musashi2 knockout mice. It is suggested that the mechanism plays an important role in chronic pain pathogenesis after traumatic injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学・発生学
科研費の分科・細目：疼痛学
キーワード：神経栄養因子, 感覚神経

１．研究開始当初の背景

RNA結合蛋白質のMusashiは、最初にショウジョウバエで同定され(Nakamura M et al. *Neuron* 1994)、のちに標的因子*ttk*69を翻訳レベルで抑制し、神経系の細胞の運命を決定することが明らかとなった(Okabe M et al. *Nature* 2001)。マウスでも相同性の高いMusashiファミリー蛋白質は2つ(Musashi1, Musashi2)同定され、神経幹細胞に強く発現していることが分かった(Sakakibara S et al. *J. Neurosci* 1997)。マウスMusashi1は標的遺伝子*m-numb*の翻訳抑制を介して、神経発生や分化に関わるNotchシグナルを制御し、神経細胞への分化抑制をしている(Imai T et al. *Mol Cel Biol* 2001)。中枢神経系以外にも広範囲に発現するMusashi蛋白質としてMusashi2が同定されたが(Sakakibara S et al. *J. Neurosci* 2002)、これまでその機能は不明であった。

申請者が作成したMusashi2欠損マウスが、知覚神経障害や運動神経障害をきたし、その原因が標的遺伝子の一つである神経軸索進展促進因子Pleiotrophinの減少によるものであることが初めて明らかになった。また申請者はMusashi2機能に関する詳細な解析を行い、終分化した神経細胞においてもPleiotrophinと共に感覚神経ネットワーク形成に重要な役割を持っていることが示唆された。

２．研究の目的

本課題ではPleiotrophin欠損動物を用い、感覚

神経のネットワーク形成メカニズムを解明することが第一目的であった。またMusashi2欠損マウスは末梢神経傷害後の神経機能回復が野生型に比較して有意に遅かったことから、Pleiotrophin欠損マウスの末梢神経損傷モデルの回復過程を解析し、特に感覚神経再生時における神経因性疼痛の出現メカニズムに迫ることが第二の目的であった。

３．研究の方法

今回、目的の研究を完遂するために、以下の６つの実験を行った。

(1) Pleiotrophin 欠損マウスの温痛覚・触覚の軸索投射異常の解析
(2) Pleiotrophin 欠損マウスの触覚や温痛覚異常を検出する行動学的解析
(3) Pleiotrophin およびその受容体の発現解析
(4) Pleiotrophin 下流シグナルメカニズムについての解析
(5) Pleiotrophin 欠損マウス末梢神経傷害後の再生感覚神経ネットワークの解析
(6) 末梢神経損傷後の温痛覚・触覚の回復を電気生理学的に評価

４．研究成果

慢性疼痛にも関与するとの報告がある背側神経節に存在する知覚神経の発生過程における、Musashi2蛋白質とその下流標的因子であるPleiotrophinの役割について解析を行った。

神経系における哺乳類Musashiの機能を明らかにするためMusashi2欠損マウスを作成し解析を行ったところ、Musashi2欠損マウスは有意な感覚神経障害を伴っていた。中枢から末梢神経系まで詳細な組織学的および電気生理学的な解析を行ったところ、背側神経節にある感覚神経細胞から脊髄への触覚を担う神経線維の投射が乱れ、本来の触覚受容領域への投射は減少し、逆に疼痛受容領域への投射異常が観察された。RNA結合蛋白質であるMusashi2に結合する標的因子を検索したところPleiotrophinが同定された。Musashi2はPleiotrophinのmRNAに特異的に結合し、その発現を転写後レベルで促進していた。Musashi2欠損マウスではPleiotrophin蛋白質量の有意な減少を認めたため、Pleiotrophin 欠損マウスの温痛覚・触覚の軸索投射異常の解析および、感覚神経の異常を検証する行動学的実験を行った。Musashi2欠損マウスと同様に、神経発生の際に3種類の感覚神経のうち、一部の感覚神経線維が、脊髄後角の本来投射するべき層とは異なる層へ神経線維連絡していることを組織学的・電気生理学的な解析によって確認した。さらに、Pleiotrophin欠損マウスの触覚や温痛覚異常を検出する行動学的解析も実施し、これまでに我々が明らかにしてきたMusashi2欠損マウスの組織学的および電気生理学的な投射異常や、Hotplate TestやvonFrey Hair Testなどの感覚神経の検査による触覚神経の異常と極めて近い所見がPleiotrophin遺伝子欠損マウスにおいても観察された。

さらに、Musashi2およびPleiotrophinのダブルヘテロ欠損マウスの触覚や温痛覚異常を検出する行動学的解析を行ったところ、再び症状が同じであったことから遺伝的関連性がさらに強く示唆された。また、神経系の細胞でPleiotrophinを過剰発現させたPleiotrophinトランスジェニックマウスとMusashi2欠損マウスを交配したところ、これまでの慢性疼痛症状がほぼ完全に回復したことから、知覚神経ネットワーク形成の発生学的メカニズムに、Musashi2およびその下流の因子であるPleiotrophinが重要な役割を担っていることが明らかとなった。感覚神経ネットワーク形成の発生学的メカニズムにMusashi2およびPleiotrophinが重要な役割を担っている全貌が明らかになりつつある。

また、神経幹細胞に強く発現するRNA結合蛋白質として同定された哺乳類Musashiに対して、ゼブラフィッシュでのMusashi1の発現解析を行い、神経系の幹細胞の未分化な細胞に強く発現することを示し、Musashi1の抑制による脳と目の著しい低形成の原因を詳細に解析することにも成功した。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 18 件）

1. Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, **Shibata S**, Yoshida Y, Gu Z, Kimura A, Ma C, Xu C, Bando W, Fujita K, Shinomiya K, Hirai T, Asou Y, Enomoto M, Okano H, Okawa A, Itoh H. “Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations.” ***Nature***. 2013 May 5. doi: 10.1038/nature12115. 査読・有
2. Ohtomo R, Mori T, **Shibata S,** Tsuta K, Maeshima M, Akazawa C, Honda K, Yamada T, Yoshimoto S, Asai M, Okano H, Kanai Y, Tsuda H. “Sox10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: A clue to the histogenesis and diagnosis” ***Modern Pathology*** 2013, Apr 5. doi: 10.1038/modpathol.2013.54. 査読・有
3. Takahashi T, Suzuki H, Imai T, **Shibata S**, Tabuchi Y, Tsuchimoto K, Okano H, Hibi T. “Musashi-1 post-transcriptionally enhances phosphotyrosine-binding domain-containing m-Numb protein expression in regenerating gastric mucosa.” ***PLoS One.*** 2013;8(1):e53540. doi:

10.1371/journal.pone.0053540. Epub 2013 Jan 4. 査読・有

4. Takano M, Hikishima K, Fujiyoshi K, **Shibata S**, Yasuda A, Konomi T, Hayashi A, Baba H, Honke K, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. “MRI characterization of paranodal junction failure and related spinal cord changes in mice” ***PLoS One.*** 2012;7(12):e52904. doi: 10.1371/journal.pone.0052904. Epub 2012 Dec 27. 査読・有
5. Kanzaki S, Fujioka M, Yasuda A, **Shibata S**, Nakamura M, Okano HJ, Ogawa K, Okano H. “Novel in vivo imaging analysis of an inner ear drug delivery system in mice: Comparison of inner ear drug concentrations over time after transtympanic and systemic injections” ***PLoS One.*** 2012;7(12):e48480. doi: 10.1371/journal.pone.0048480. Epub 2012 Dec 12. 査読・有
6. Omoto M, Yoshida S, Miyashita H, Kawakita T, Yoshida K, Kishino A, Kimura T, **Shibata S**, Tsubota K, Okano H, Shimmura S. “The Semaphorin 3A Inhibitor SM-345431 Accelerates Peripheral Nerve Regeneration and Sensitivity in a Murine Corneal Transplantation Model.” ***PLoS One.*** 2012;7(11):e47716. doi: 10.1371/journal.pone.0047716. Epub 2012 Nov 9. 査読・有
7. Takagi T, Kimura Y, **Shibata S**, Saito H, Ishii K, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Tabata Y, Nakamura M. “Sustained bFGF-Release Tubes for Peripheral Nerve Regeneration: Comparison with Autograft.” ***Plast Reconstr Surg.*** 2012 Oct;130(4):866-76. PMID: 23018697 査読・有
8. **Shibata S**, Umei M, Kawahara H, Yano M, Makino S, Okano H. “Characterization of the RNA-binding protein Musashi1 in zebrafish.” ***Brain Research.*** 2012 Jun 26;1462:162-73. Epub 2012 Feb 3, doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.068, PMID: 22429745,
9. Yasuda A, Tsuji O, **Shibata S**, Nori S, Takano M, Kobayashi Y, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Hara CM, Miyawaki A, Okano HJ, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. “Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord.” ***Stem Cells.*** 2011 Dec;29(12):1983-94. doi: 10.1002/stem.767. PMID: 22028197 査読・有
10. Renault-Mihara F, Katoh H, Ikegami T, Iwanami A, Mukaino M, Yasuda A, Nori S, Mabuchi Y, Tada H, **Shibata S**, Saito K, Matsushita M, Kaibuchi K, Okada S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. “Beneficial compaction of spinal cord lesion by migrating astrocytes through glycogen synthase kinase-3 inhibition.” ***EMBO Molecular Medicine***. 2011 Nov;3(11):682-96. doi: 10.1002/emmm.201100179. PMID: 21898827 査読・有
11. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura K, **Nagoshi N**, **Shibata S**, Rao TN, Fehling HJ, Fukatsu A, Minegishi N, Kita T, Kimura T, Okano H, Yamamoto M, Yanagita M. “Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice.” ***Journal of Clinical Investigation.*** 2011 Oct;121(10):3981-90. doi: 10.1172/JCI57301. PMID: 21911936 査読・有
12. Katoh H, **Shibata S**, Fukuda K, Sato M, Satoh E, **Nagoshi N**, Minematsu T, Matsuzaki Y, Akazawa C, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. “The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest.” ***Molecular Brain.*** 2011 Sep 23;4:34. doi: 10.1186/1756-6606-4-34, PMID: 21943152, PMCID: PMC3215936 査読・有
13. Takagi T, Ishii K, **Shibata S**, Yasuda A, Sato M, **Nagoshi N**, Saito H, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. “Schwann-spheres derived from injured peripheral nerves in adult mice--their in vitro characterization and therapeutic potential.” ***PLoS One.*** 2011;6(6):e21497. doi: 10.1371/journal.pone.0021497, PMID: 21720551, PMCID: PMC3123355 査読・有
14. **Nagoshi N**, **Shibata S,** Hamanoue M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. “Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing.” ***Glia*** 2011 May;59(5):771-84. doi: 10.1002/glia.21150. Epub 2011 Feb 23, PMID: 21351159 査読・有
15. Hosoya M, Fujioka M, Matsuda S, Ohba H, **Shibata S**, Nakagawa F, Watabe T, Wakabayashi KI, Saga Y, Ogawa K, Okano HJ, Okano H. “Expression and Function of Sox21 During Mouse Cochlea Development.” ***Neurochem Res.*** Jul;36(7):1261-9. Epub 2011 Feb 3. PMID: 21287267, doi: 10.1007/s11064-011-0416-3 査読・有

16. **Shibata S**, Yasuda A, Renault-Mihara F, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, **Nagoshi N**, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H. "*Sox10*-Venus mice: a new tool for real time labelling of neural crest lineage and oligodendrocytes." ***Molecular Brain.*** 2010 Oct 31; 3(1):31. 査読・有
17. Aihara Y, Hayashi Y, Hirata M, Ariki N, **Shibata S**, **Nagoshi N**, Nakanishi M, Ohnuma K, Warashina M, Michiue T, Uchiyama H, Okano H, Asashima M, Kusuda Furue M, "Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture" ***Int. J. Dev. Biol.*** 2010;54(8-9):1287-1294. 査読・有
18. Suzuki S, Namiki J, **Shibata S**, Mastuzaki Y, Okano H. "The Neural Stem/progenitor Cell Marker Nestin is Expressed in Proliferative Endothelial Cells, but Not in Mature Vasculature" ***Journal of Histochemistry and Cytochemistry*** 2010 Aug;58(8):721-730. 査読・有

〔学会発表〕（計 10 件）

国際学会

1. **Shibata S**; Okano H "***SENSORY NEURON TRAJECTORIES ARE REGULATED BY AN RNA-BINDING PROTEIN THAT MODIFIES EXPRESSION OF A NEUROTROPHIN***" The 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research 2013 (Boston, USA) June 12-15, 2013 (Poster presentation)
2. **Shibata S**; Okano H "***Role of Musashi2 in Mechanoreceptive neural network formation***" The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry (Kobe, Japan) September 30 - October 2, 2012 (September 30th Poster presentation)
3. **Shibata S**; Okano H "***MECHANORECEPTIVE NEURAL NETWORK WITH RNA BINDING PROTEIN MUSASHI2***" The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research 2012 (Yokohama, Japan) June 13-16, 2012 (June 15th Poster presentation)
4. **Shibata S**; Sakakibara SI; Furue H; Yoshimura M; Okano HJ; Okano H "***Touch and pain receptive network formation with RNA binding protein Musashi2 and Pleiotrophin***" Society for Neuroscience 2010 (San Diego CA, USA) November 13-17, 2010 (November 13th Poster presentation)

国内学会

1. **Shibata S**, Umei M, Kawahara H, Okano H. "***Characterization of the RNA-binding protein Musashi1 in zebrafish.***" 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (山梨県甲府市) 2012 年 3 月 26 日-28 日 (3/26 ポスター発表)
2. **Shibata S**, Okano H. "***感覚神経ネットワーク形成を担う RNA 結合蛋白質 Musashi2***"第 54 回日本神経化学会大会 (石川県加賀市) 2011 年 9 月 26 日-28 日 (9/27 ポスター発表)
3. **Shibata S**, Okano H. "***Sensory network formation with RNA binding protein Musashi2***" 第34回日本神経科学大会 (神奈川県横浜市) 2011 年 9 月 14 日-17 日 (9/16 ポスター発表)
4. **Shibata S**, Yasuda A, Renault-Mihara F, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, Nagoshi N, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H. "***Sox10-Venus mice: a new tool for real time labelling of neural crest lineage and oligodendrocytes.***"第 88 回日本生理学会大会/第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 (神奈川県横浜市) 2011 年 3 月 28 日-30 日
5. **Shibata S**; Okano H ***"New aspects on the migration and differentiation of neural crest stem cells"***第 33 回日本神経科学大会 Neuro2010 (Joint Conference of The 33rd annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. The 53rd Annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry. The 20th Annual Meeting of Japanese Neural Network Society) (兵庫県神戸市) 2010 年 9 月 2-4 日 (9/4 シンポジウムにて口頭発表)
6. **Shibata S**; Sakakibara SI; Furue H; Yoshimura M; Okano HJ; Okano H ***"Sensory neural network formation with RNA binding protein Musashi2"*** 第 33 回日本神経科学大会 Neuro2010 (兵庫県神戸市) 2010 年 9 月 2-4 日 (9/2 ポスター発表)

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.okano-lab.com/

６．研究組織
(1)研究代表者
芝田 晋介 （SHIBATA SHINSUKE）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70407089

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
佐藤 桃香 (SATO MOMOKA)
慶應義塾大学・医学部・特別研究助教
研究者番号：00548513
(H22-H23 まで連携研究者として参画)

名越 慈人 (NAGOSHI NARIHITO)
独立行政法人国立病院機構村山医療センター（臨床研究センター）・整形外科・研究員
研究者番号：10383837